

## Monitoring of refractive index of optical sensor for determination of surface structure changes

Patent number: JP11512186T

Publication date: 1999-10-19

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: **G01N21/55; G01N33/543; G01N21/55; G01N33/543;**  
(IPC1-7): G01N33/543; G01N21/21; G01N21/27

- european: G01N21/55B2; G01N33/543K2

Application number: JP19960511123T 19960830

Priority number(s): WO1996SE01074 19960830; SE19950003028  
19950901

Also published as:



WO9709618 (A1)

EP0852010 (A1)

US6127183 (A1)

EP0852010 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP11512186T

Abstract of corresponding document: **US6127183**

PCT No. PCT/SE96/01074 Sec. 371 Date Aug. 26, 1998 Sec. 102(e) Date Aug. 26, 1998 PCT Filed Aug. 30, 1996 PCT Pub. No. WO97/09618 PCT Pub. Date Mar. 13, 1997 The invention relates to a method of analysing a chemical or physical interaction taking place in a film layer at an optical sensor surface when the film layer is contacted with a fluid sample containing a species capable of interacting with the film layer, wherein the interaction is monitored by determination of the refractive index of the film layer through a light-intensity signal producing technique by measuring the relationship between a parameter of the incident and/or reflected light and one of the minimum, the maximum and the centroid of the light intensity signal curve. The method is characterized by also monitoring the variation of the light intensity signal value at said minimum, maximum or centroid with time to determine at least one of (i) the degree of homogeneity of sample species concentration in the sensed film layer volume to determine therefrom when the interaction is mass transport limited and when the interaction is kinetically controlled, a varying light intensity signal level indicating mass transport limitation and a stabilized light intensity signal level indicating kinetic control; and (ii) the degree of resulting homogeneity/heterogeneity in the sensed film layer volume during or after the interaction, a changed stabilized light intensity signal level indicating and corresponding to the degree of a change in homogeneity/heterogeneity.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-512186

(43) 公表日 平成11年(1999)10月19日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/543  
21/21  
21/27

識別記号

5 9 3

F I

G 0 1 N 33/543  
21/21  
21/27

5 9 3

Z

C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願平9-511123  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996)8月30日  
(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998)3月2日  
(86) 国際出願番号 PCT/SE96/01074  
(87) 国際公開番号 WO97/09618  
(87) 国際公開日 平成9年(1997)3月13日  
(31) 優先権主張番号 9503028-4  
(32) 優先日 1995年9月1日  
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), JP, US

(71) 出願人 バイアコア アーベ  
スウェーデン国 ウプサラ, エス-751  
82  
(72) 発明者 イバーソン, ベント  
スウェーデン国 パーリンジ, エス-740  
22, フォーグデリバーゲン 22  
(72) 発明者 ステンバーグ, エサ  
スウェーデン国 ウプサラ, エス-753  
36, フォルカンガガタン 20ビー  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 表面構造変化の決定のための光センサの屈折率の監視

(57) 【要約】

本発明は、光センサ表面の膜層中において、膜層と相互作用し得る種を含有する流体試料と接触するとき膜層で起こる化学的または物理的な相互作用を分析する方法であって、該相互作用は、入射光および/または反射光のパラメータと、光強度信号曲線の最小、最大および重心のうちの1つとの間の関係を測定することにより、光強度信号生成技術を用いて膜層の屈折率を決定することによって監視される方法を提供する。この方法はまた、光強度信号の最小、最大、または重心における値の経時変動を監視して、(i)相互作用が制限された質量輸送であるときおよび該相互作用が動力学的に制御されるべきときを決定するための、感知された膜層体積内の試料種濃度の均一性の程度であって、変動する光強度信号レベルは質量輸送制限を示し、安定した光強度信号レベルは動力学的制御を示す、試料種濃度の均一性の程度、および(ii)相互作用中または該相互作用後の感知された膜層体積内の均一性/不均一性の程度であって、安定した光強度信号レベルの変化は均一性/不均一性の変化の程度を示し、またこの変化の程度に対応する、均一性/不均一性

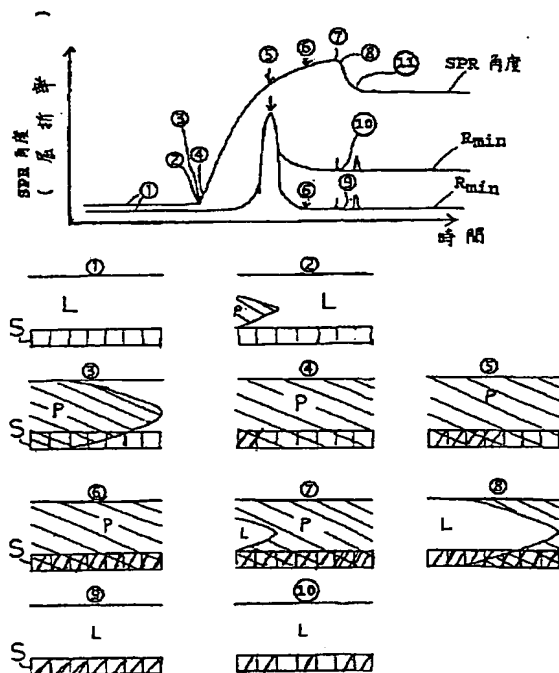


FIG. 1

**【特許請求の範囲】**

1. 光センサ表面の膜層が、該膜層と相互作用し得る種を含有する流体試料と接触するとき該膜層で起こる化学的または物理的な相互作用を分析する方法であつて、該相互作用は、入射光および／または反射光のパラメータと、光強度信号曲線の最小、最大および重心のうちの1つとの間の関係を測定することにより、光強度信号生成技術を用いて該膜層の屈折率を測定することによって監視される方法において、該光強度信号の該最小、最大、または重心における値の経時変動を監視して、(i)該相互作用が制限された質量輸送であるときおよび該相互作用が動力学的に制御されるときを決定するための、感知された膜層体積内の試料種濃度の均一性の程度であつて、変動する光強度信号レベルは質量輸送制限を示し、安定した光強度信号レベルは動力学的制御を示す、試料種濃度の均一性の程度、および(ii)該相互作用中または該相互作用後の該感知された膜層体積内で得られる均一性／不均一性の程度であつて、安定した光強度信号レベルの変化は均一性／不均一性の変化の程度を示し、またこの変化の程度に対応する、均一性／不均一性の程度のうちの少なくとも一方を決定することを特徴とする、方法。
2. 前記流体試料は液体であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。
3. 前記光強度信号値を監視することにより、前記相互作用が動力学的に制御される時間間隔を決定すること、および該時間間隔中に測定された屈折率と時間との間の関係から、前記試料種の前記表面層との相互作用のための会合および／または解離定数を決定することを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。
4. 前記相互作用が動力学的に制御されるとき、前記会合および／または解離定数の決定を自動的に開始することを特徴とする、請求項3に記載の方法。
5. 前記光強度信号値を監視することにより、前記相互作用が制限された質量輸送である時間間隔を決定すること、および該時間間隔中に測定された屈折率と時間との間の関係から、前記試料種の濃度を決定することを特徴とする、請求項3に記載の方法。
6. 試料種濃度ならびに会合および／または解離定数の両方を決定することを特徴とする、請求項3または4および5に記載の方法。

7. 前記均一性／不均一性は、前記膜層の物理的条件、熱力学的条件、および化学的条件のうちの1つ以上の条件に関連することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. 前記表面膜層の均一性／不均一性は、沈殿、凝集または凝析反応により生じるタンパク質凝集体、生物学的な細胞および細胞膜フラグメントのような膜複合体、酵素反応によって生じる高分子生成物複合体、および細胞生成物複合体から選択されることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

9. 前記測定された均一性／不均一性に関連して前記試料種濃度を追加して測定することを特徴とする、請求項8に記載の方法。

10. 前記センサ表面膜層に反応体リガンドを予め固定し、その内部の得られるリガンド濃度または構造の任意の不均一性を決定することを特徴とする、請求項9に記載の方法。

11. 時間に対する前記光強度信号曲線の半値幅を追加して測定することによって、前記感知された膜体積内の得られる均一性／不均一性の程度についての追加の情報を得ることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1つに記載の方法。

12. 前記光強度信号生成技術が反射計使用法、反射偏光解析法、反射干渉計使用法または導波管内の共鳴誘導モード検出法に基づくことを特徴とする、請求項1～11のいずれか1つに記載の方法。

13. 前記技術が、表面プラスモン共鳴、ブルスター角、臨界角、偏光解析または共鳴モード結合の測定を含む内部反射に基づくか、またはブルスター角または偏光解析の測定を含む外部反射に基づくことを特徴とする、請求項12に記載の方法。

14. 前記光のパラメータが、波長、入射角および偏光状態から選択されることを特徴とする、請求項1～13のいずれか1つに記載の方法。

15. 少なくとも2つの異なる波長および固定入射角を用いて前記相互作用を監視することを特徴とする、請求項14に記載の方法。

16. 少なくとも2つの異なる波長および少なくとも2つの異なる入射角を用いて前記相互作用を監視することを特徴とする、請求項14に記載の方法。

17. 所定の入射角または波長範囲の連続スキャンを用いて前記相互作用を監視することを特徴とする、請求項14に記載の方法。
18. 少なくとも2つの異なる偏光状態、固定入射角および波長を用いて前記相互作用を監視することを特徴とする、請求項14に記載の方法。
19. 所定の偏光状態範囲の連続スキャンを用いて前記相互作用を監視することを特徴とする、請求項14に記載の方法。
20. 多くの波長で測定された内部反射データを用いて、エバネセント波の貫入深さであって、波長に依り変動する該貫入深さの方向の均一性／不均一性の状態を決定することを特徴とする、請求項13に記載の方法。
21. 単一の光ビームを用いて、相互作用を二つ以上のセンサ表面で同時に分析することを特徴とする前記請求項のいずれか1つに記載の方法。
22. 前記流体試料は、液体フロー、好ましくはフローセル中で前記膜層と接触することを特徴とする、前記請求項のいずれか1つに記載の方法。
23. 前記入射光および／または反射光のパラメータ、ならびに前記光強度信号曲線の最小および重心のいずれか一方が測定され、また該光強度信号の最小値の経時変動を監視することを特徴とする、前記請求項のいずれか1つに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 表面構造変化の決定のための光センサの屈折率の監視

#### 発明の分野

本発明は、光強度信号生成技術による屈折率決定を用いた、光センサ表面における膜層中で起こる物理的または化学的相互作用を分析するための、改良された方法に関する。

#### 発明の背景

近年、生体分子の相互作用を測定および定量化するためのいくつかのいわゆる標識不要光技術(label-free optical technique)が開発され、表面感度測定技術(surface sensitive measuring technique)への関心が非常に高まっている。そのような光技術で現在のところよく用いられているものは、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance)に基づくものである(以下SPRと呼ぶことがある)。

光学的濃度の高い(すなわち高屈折率を有する)媒体から光学的濃度の低い(すなわち低屈折率を有する)媒体へと光が伝わる時、光が界面に交わる角度が臨界角を越えると、2つの媒体の間の界面において全内反射(TIR)が起こる。TIRが起こるとき、電磁「エバネセント波(evanescent wave)」が界面から離れて低屈折率媒体中に伝播していく。

界面を所定の導電性材料(例えば金または銀)の薄い層でコーティングすると、エバネセント波は、導電体表面の自由電子群(free electron constellation)(プラズモンと呼ばれる)と結合し得る。このような共鳴結合は、入射光の特定の角度において起き、光エネルギーを吸収し、その角度における反射光強度に特徴的な低下をきたす。表面電磁波は、より強い電界を有し、低濃度媒体を貫通していく第2のエバネセント波を生成する。

共鳴角度は、入射光の波長ならびに導電性膜の性質および厚さを含む、多くの要因に依存する。しかし最も重要なのは、表面プラズモン波のエバネセント波が伝播していく媒体の屈折率に、この角度が依存することである。その他の要因が

一定に保たれるとき、共鳴角度は従って低濃度媒体の屈折率の直接の尺度となり

、この角度は媒体中の屈折率変化に非常に敏感である。この依存性を説明する誘電式の詳細な記載については、Kretschmann、E.、Z. Phys. B241、313(1971)を参照のこと。

SPRエバネセント波は、界面からの距離に従って指数的に減衰し、低屈折率媒体中およそ1波長の深さまで効果的に貫通する。従って、界面に非常に近い屈折率変化のみが検知され得る。

金属膜を、感知層と接触する流体サンプル中に存在する分子（例えば抗原）と特異的相互作用を起こし得るような適切な感知層（例えば抗体）で覆えば、SPR型化学的センサを構築することができる。センサ表面における相互作用により、溶質濃度および結合表面濃度が変化し、従ってエバネセント波の貫通範囲における屈折率が変化する。反射率曲線（反射光強度対入射角または波長）の経時変化を測定する（この変化は表面屈折率に相関している）、様々なSPR型化学センサが開発されている。

光をセンサ表面と相互作用させるために、様々な技術を用い得る。通常用いられる検知システムは、Kretschmann構成（KretschmannおよびRaether、Z. Naturforsch. Teil A 23: 2135-2136、1968）に基づくものである。この構成において、薄い反射性金属（金または銀）の層がプリズムのベース上に堆積され、TM偏光された単色性光がプリズムによってSPR波に結合される。

Kretschmann構成に基づいて構築された市販のバイオセンサシステムの一例として、Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, Sweden)によって販売されているBIAcore<sup>TM</sup>がある。このバイオセンサシステムは、Kretschmann構成型SPR検知システムならびに、分析に必要な試薬の流れを制御するためのマイクロ流体システムを有している。この装置を用いて、センサ表面で起こる生体分子相互作用をリアル

タイムで監視することができる。この装置およびその理論的背景は、Jönssonら、1991、BioTechniques 11、620-627に十分な記載がある。また、本発明者らのUS-A-5,313,264号も参照せよ。

生体分子相互作用を監視する際、経時的なSPR応答あるいはまたは表面膜屈折率の展開を追う。この関係から、生体分子分析物濃度を決定し得るだけでなく、

生体分子のセンサ表面との相互作用についての会合速度定数および解離速度定数などの動力学的パラメータを決定し得る。

反射最小値角度の代わりに、反射曲線の重心 (centroid) の角度を監視してもよい。

SPR (すなわち反射率最小値) が起こる入射光の角度を測定するかわりに、上述のように、一定の角度で光を導入してSPRが起こる波長を測定するSPRセンサもある (例えばUS-A-5,359,681号を参照)。しかしどちらの場合においても、SPRは反射率曲線の反射率最小値を表している。

動力学的パラメータを検討する際にはもちろん、表面における相互作用がいかなるときに質量輸送制限され、いかなるときに反応動力学的に調節されるかを知ることが重要である。これは上述の屈折率対時間の曲線からはすぐに知り得ないことがあり、従って常に動力学的定数を誤って評価する危険性がある。さらに、表面における相互作用が何らかの表面の構造変化を起こして不均一性を生じたか否かを、容易には屈折率対時間の曲線からは決定し得ないことがある。

化学的SPRセンサ以外の文脈においては、反射率最小値 ( $R_{\min}$ ) の強度および反射率曲線の半値幅 (halfwidth) ( $\Phi_{1/2}$ ) などのパラメータが検討されている。

Pockrand, I., Surface Science, vol. 72, p. 577-588 (1978) は、減衰全反射 (attenuated total reflection) (ATR) 構成を用いてSPRを励起することにより、金属表面に沿って伝播していく表面プラズマ振動の性質に対する、薄い誘電体コーティングの影響を記述している。共鳴曲線の全体的なシフトおよび広幅化が観察されている。共鳴 $R_{\min}$ の深さは、透明コーティングによる影響は受けないが、吸収コーティングの厚さに強く依存する。

Fontana, E., PantellおよびMoslehi, Applied Optics, vol. 27, (1988) p. 333 6は、表面プラズモン分光分析を用いて、誘電体コーティングされた金属鏡を特徴付けている。SPR角度シフト、半値幅および反射率最小値についての分析的表現が記載されている。

Chu, K. C. ら, Mol. Cryst. Liq. Cryst., vol. 59, p. 97~108 (1980) は、表面プラズモン共鳴技術によって、温度の関数としての金上の4-シアノ-4'-n-ペンチルビフェニルの等方的ネマチック相転移の研究を開示している。反射率曲線半

値幅の変化および2つの反射ディップの発生が観察された。2つの共鳴角度のうち一方が等方相の屈折率に対応し、他方がネマチック相の屈折率に対応する。「2重ディップ反射率曲線」のディップ深さ間の関係を、2つの相の各々における媒体の割合(fraction)の尺度として用いた。

Pollard、J.D.、およびSambles、J.R.、Optics Communications、vol.64、p.529~533(1987)は、濃縮化液体の2つの相(すなわち液滴および均一膜としてそれぞれ)の横方向拡がりの研究としての、SPR反射率曲線パラメータ、反射率最小値角度、反射率最小値深さ、および反射率曲線幅の時間依存性の分析を記載している。照明された金表面の異なる部分における2つの異なる屈折率の存在により、2つの反射率曲線が得られ、これらをあわせて2つの最小値を有する1つの反射率曲線が得られている。各最小値の深さは、金表面の相互的被覆率(mutual degree of coverage)に対応する。

RothenhäuslerおよびKnoll、Surface Science、vol.191、p.585~594、(1987)は、KretschmannATR構成において、銀-空気界面のp-偏光レーザ光での反射率対角度スキャンを開示している。もしサンプルフィルム上のレーザスポットの領域内にある厚さから別の厚さへの段差があれば、2つの共鳴最小値が得られる(各々は2つの「無限」層構造のうち1つに対応する角度における)。これら共鳴最小値の強度は、レーザスポットが覆う2つの異なる界面の相対面積割合に依存する。

RothenhäuslerおよびKnoll、Appl. Phys. Lett.、vol.51、p.783~785、(1987)は、異なる層構造を有する2つの媒体からなる不連続膜を調べるために、SPRを回折と組み合わせて使用することを開示している。2つの同時のSPRの反射率最小値間の相互関係を用いて、各媒体について表面被覆率を決定している。

YeatmanおよびAsh、SPIE、vol.897、p.100~107、(1988) p.107は、生物学的単一層および他の重畳層における横方向構造(表面不均一性分布)を調べるための、SPR顕微鏡法(microscopy)技術を開示している。反射率最小値の位置、幅、および深さを測定することによって、異なるコントラストメカニズムを、これら3パラメータに対するその異なる相対効果に基づいて分離され得ることが、提案されている。

Zhang, Y. ら、Surface Sci., vol. 184, p. 214~226, (1987) は、ポリスチレン膜の金属表面への吸着の動力学の研究のための、表面プラズモン振動の使用を記載している。共鳴角度シフト、ディップの半値幅および共鳴最小値の値を用いて、吸着された層の特徴を決定している。

Silin, V. I. ら、Optics Communications, vol. 97, p. 19~24, (1993) は、バイオセンサシステムにおける表面プラズモン線の広幅化を開示している。このバイオセンサシステムにおいて、検討される膜の不規則性、荒さ、あるいは不連続構造に起因して抗原-抗体型の免疫学的反応が起こり、反射率曲線の最小角度の測定における感度が急激に減少する。

Salamon, Z., Wang, Y., Tollin, G. および Macleod, H., Biochimica et Biophysica Acta, 1195(2), P. 267~75 (1994) は、表面プラズモン共鳴の実験結果についての理論的モデリングにより、自己集合した脂質2重層(lipid bilayer)の厚さ、屈折率、および消光係数(extinction coefficient)を決定し、そして吸着された質量および体積を計算することを報告している。この計算されたデータから、脂質層の平均安定状態構造を特徴付ける。脂質層の堆積は、SPR反射率曲線を以下のように変化させ得ることが示されている。すなわち、(i) 共鳴最小値の位置がより大きな入射角側にシフトする；(ii) 共鳴最小値における反射光強度が増加する；(iii) SPR曲線が幅広化する。1つの共鳴最小値のみが観察されるときは、サンプル分子の銀表面の被覆率が均一であることを示している。

要するに、上述のように従来技術においては表面プラズモン共鳴曲線の形状がSPRプローブされる固体または液体膜に関してある種の構造的情報を含み得ることが認識されている一方、反射率最小値の値（すなわち深さ）または反射率曲線の半値幅の測定は、表面相互作用の監視するためのSPR型バイオセンサ適用には用いられてこなかった。また、その場合にそのような反射率曲線情報が有用であることは示唆されていない。

#### 発明の要旨

本発明の一つの目的は、光センサにおいて起こる相互作用の表面屈折率測定を用いた分析（SPRなど）において、相互作用がいかなるときに質量輸送制限され

いかなるときに反応動力学的に調節されるかを決定するための手段を提供することである。

本発明の別の目的は、光センサにおいて起こる相互作用の表面屈折率測定を用いた分析（SPRなど）において、相互作用中または相互作用に起因して起こる感知表面層中の不均一性の度合いを決定するための手段を提供することである。

本発明により、上記およびその他の目的および利点が、光強度信号曲線の最小値、最大値または重心を測定することにより表面における屈折率変動を監視することに加えて、最小値、最大値または重心における光強度信号の値の変動を監視すること、およびオプションとして光強度信号曲線の半値幅を監視することによって達成し得ることが見いだされた。

特に、信号強度最小値レベルまたは最大値レベルが変動することは、表面における相互作用が質量輸送制限されることを表しており、最小値レベルまたは最大値レベルが一定していることは、相互作用が反応動力学的に調節されることを表すことが見いだされた。これにより、従来技術における方法に比較して簡便にかつ実質的に高い精度で、動力学的定数を測定することが可能になる。

さらに、一定の最小値レベルまたは最大値レベルが変化する（増加したあるいは減少した）ことは、感知される膜において対応する均一性／不均一性変化があることを示す。このことにより、例えば、感知される膜における均一／不均一性変化の時間および度合いを正確に決定し得る。

従って、本発明は、光センサ表面の膜層が、該膜層と相互作用し得る種を含有する流体試料と接触するとき該膜層で起こる化学的相互作用（生化学的相互作用を含む）または物理的相互作用（生物物理学的相互作用を含む）を分析する方法であって、該相互作用は、入射光および／または反射光のパラメータと、光強度信号曲線の最小、最大および重心のうちの１つとの間の関係を測定することにより、光強度信号生成技術を用いて該膜層の屈折率を決定することによって監視される方法を提供する。この方法は、屈折率を監視することに加えて、光強度信号の該最小、最大、または重心における値の経時変動を監視して、(i) 相互作用が制限された質量輸送であるときおよび該相互作用が動力学的に制御されることを決定するための、感知された膜層体積内の試料種濃度の均一性の程度であって、

変動する光強度信号レベルは質量輸送制限を示し、安定した光強度信号レベルは動力学的制御を示す、試料種濃度の均一性の程度、および(ii)相互作用中または該相互作用後の感知された膜層体積内の均一性／不均一性の程度であって、安定した光強度信号レベルに変化は均一性／不均一性の変化の程度を示し、またこの変化の程度に対応する、均一性／不均一性の程度のうちの少なくとも一方を決定することを特徴とする。

屈折率を測定するために使用される光強度信号生成技術は、従来の反射計使用法、反射偏光解析法、反射干渉計使用法、および導波管内の共鳴誘導モード検出法を含む様々な確立された光学方法から選択され得る。これらの方法は反射率の最小値の検出に基づき、この最小値はまた、例えば、異なる偏光方向を有する光からの反射強度を関連付けることによって、光強度信号の最大値としても表され得る。

従来の反射計使用法では、センサ表面の光反射率（反射定数の絶対値）が、適切なパラメータ、通常は入射角および／または波長の関数として反射光強度を介して測定される。反射モードは内部（エバネセント波を含む）または外部であり得る。内部反射方法としては、表面プラズモン共鳴 (SPR)、ブルースター角および臨界角に基づいた方法があり得る。外部反射方法はブルースター角検出法を含む。

反射偏光解析法では、センサ表面によって導入される反射光の偏光状態についての位相シフト（反射定数の位相）が、適切なパラメータ、通常は偏光子（検光子）の角度、補償板の角度、入射角、または波長の関数として検出光強度を介して測定される。反射モードは内部（エバネセント波偏光解析法）または外部（従来の偏光解析法）であり得る。

反射干渉計使用法では、センサ表面によって導入され、反射光の強度または偏光状態を変える位相シフト（反射定数の位相）が、適切なパラメータ、通常は偏光子（検光子）の角度、補償板の角度、入射角または波長の関数として検出光強度を介して測定される。反射モードは内部（エバネセント波を含む）または外部であり得る。

導波管内の共鳴誘導モード検出法では、センサ表面によって導入され、その吸

収または位相シフトにより光の透過を変えるモード結合が、適切なパラメータ、通常は入射角または波長の関数として検出光強度を介して測定される。反射モードは内部（エバネセント波を含む）である。この検出技術を用いる方法としては、減衰全反射(frustrated total reflection)（共鳴キャビティ）に基づく方法がある。

光は、透過、格子結合、または共鳴ミラー装置におけるような減衰全内部反射を介する結合（エバネセント波結合）を通してセンサ表面と相互作用し得る。

本発明の方法は、例えば、少なくとも2つの波長と固定入射角との組み合わせによって行われ得る。別の例としては、少なくとも2つの波長と少なくとも2つの入射角との組み合わせを用いてもよい。別の例では、所定の入射角または波長範囲が連続スキャンされる。さらに別の例としては、少なくとも2つの異なる偏光状態ならびに固定入射角および波長を用いて監視を行ってもよい。別の例では、所定の偏光状態範囲が連続してスキャンされる。

流体試料は原則的にはガスであってもよいが、通常は液体である。

本発明の方法は、当然ながら、当該分野では本質的に既知であるように、2つ以上のセンサ表面を同時に監視する場合に用いられ得る。

本発明の1つの実施態様は、反射率の最小値または最大値を監視することにより、表面の相互作用が動力的に制御される時間間隔を決定すること、およびこの時間間隔中に測定された屈折率と時間との関係から、試料種の表面層との相互作用のための会合および／または解離定数を決定することを包含する。好ましくは、このような動力的定数決定は、例えば定数の評価で用いられるソフトウェアを改変することによって、相互作用が動力的に制御されることが決定されるとき自動的に開始される。

本発明の別の実施態様は、反射率の最小値または最大値を監視することにより、表面の相互作用が制限された質量輸送である時間間隔を決定すること、およびこの時間間隔中に測定された屈折率と時間との関係から、試料種の濃度を決定することを包含する。多くの場合、濃度と動力的定数の両方を決定することが望ましい。

膜層の均一性／不均一性は、通常は、膜層の物理的条件（濃度構造、タンパク

質凝集体、結晶性、位相、ガス)、熱力学的条件(温度、表面エネルギー)、および化学的条件(pH、イオン強度、電荷)のうちの1つ以上の条件に関連する。

試料(分析物)分子の大きさに依存して、2つの異なる場合が識別され得る。

(i) 溶液中の高分子試料(例えば、タンパク質)が固定化膜に結合するかまたはこれと反応し、固定化膜は活性化され、この結果変化して、より均一にまたはより不均一になる。前者の場合では、反射率の最小値は、試料の添加前より高いレベルで安定し、一方、後者の場合では、反射率の最小値は、低レベルで安定する。これについては後にもっと詳しく述べる。次いで、基準センサ表面では試料結合の均一性が検出されなければならない。これにより、測定され定量化された均一性の変化は固定化膜に起因し得る。

(ii) 溶液中の低分子試料(例えば、薬物、センサの体積より外側の溶液中の細胞によって生成される低分子)が固定化膜に結合するかまたはこれと反応し、固定化膜は活性化され、この結果変化して、より均一にまたはより不均一になる。しかし、これらの低分子はこれら自体では屈折率を有意に変化させることはできないが、高分子の固定化膜の有意な構造変化を活性化させ得る。

多くの場合、膜層の均一性/不均一性の特定の変化に関連する試料種濃度を決定することは価値があり得る。均一性/不均一性の決定はまた、予め固定された反応体の濃度または構造の、均一性に関連した品質管理として用いられ得る。

特に、表面膜層の不均一性は、沈殿、凝集または凝析反応により生じるタンパク質凝集体、生物学的な細胞および細胞膜フラグメントなどの膜複合体、酵素反応によって生じる高分子生成物複合体、および細胞生成物複合体から選択される。

タンパク質溶液の安定性試験は、試料内のタンパク質凝集体による結合タンパク質膜内の結合タンパク質濃度および不均一性を同時に決定することによって行われ得る。

不均一性が膜複合体よりなるときは、結合試料濃度、および生物学的な細胞または細胞膜フラグメントなどの粒子試料の関連する結合または遊離の同時決定が行われ得る。

不均一性が高分子生成物複合体よりなるときは、結合試料濃度、および、(凝

血系または免疫補体系におけるような)凝固、汚れ、酵素カスケード反応などの

関連する酵素産生、活性化または阻害の同時決定が行われ得る。

不均一性が細胞接着分布または細胞産物複合体よりなるときは、センサ表面結合試料濃度または溶液濃度、および増殖または分解などの関連する細胞接着分布または細胞分子産生の同時決定が行われ得る。

問題の光強度信号曲線の半値幅をも監視することにより、感知された表面体積内の均一性／不均一性の状態についての追加の情報が提供され得る。

内部反射に基づく方法の場合には、多くの波長で測定されたデータを用いて、エバネセント波の貫入深さであって、波長に依り変動する貫入深さの方向の均一性／不均一性の状態を決定し得る。

以下に本発明を、添付の図面を参照して、主にSPR検出に関連してさらに詳細に述べる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、(i)表面相互作用のSPR測定についての、センサ記録(SPR応答対時間)、および反射率最小値対時間曲線の模式的なオーバーレイプロット、ならびに(ii)センサ記録および反射率最小値曲線の規定された部分に対応したフローセル内の異なる状態を例示した、フローセルのいくつかの模式断面図を示す。

図2aは、トリプシンと固定化されたトリプシンインヒビターとの相互作用についての、センサ記録(SPR応答対時間)、および反射率最小値対時間曲線のオーバーレイプロットである。

図2bは、図2aにおける相互作用に対応する、2-フェーズ膜モデルで3つの異なる屈折率について計算した反射率対入射角曲線のプロットである。

図3aは、ウサギ抗マウスIgGの吸着についての、センサ記録(SPR応答対時間)および反射率最小値対時間曲線のオーバーレイプロットである。

図3bは、図3aにおける相互作用に対応する、2-フェーズ膜モデルで3つの異なる屈折率について計算した反射率対入射角曲線のプロットである。

図4aは、モノクローナル抗体と固定化されたウサギ抗マウスIgGとの相互作

用についての(ただし擬集体形成により相互作用がセンス表面において持続的な不均一性を生じる)、センサ記録(SPR応答対時間)および反射率最小値対時間曲線

の図 3 a のオーバレイプロットに類似したオーバレイプロットである。

図 4 b は、図 4 a における相互作用に対応する、2-フェーズ膜モデルで 4 つの異なる屈折率について計算した反射率対入射角曲線のプロットである。

図 4 c は、図 4 a における相互作用に対応する、3-フェーズ膜モデルで 4 つの異なる屈折率について計算した反射率対入射角曲線のプロットである。

#### 発明の詳細な説明

図 1 には、分析物含有試料溶液と、例えば、BIAcore™システム(Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Sweden)で得られるフローセル中で表面固定化された反応物との相互作用についての、SPRにより得た典型的な反射率曲線(SPR応答、すなわち共鳴角度対時間の曲線)、すなわちセンサ記録、およびこれに対応する反射率最小値( $R_{\min}$ )曲線が、オーバレイフォーマットで模式的に図示されている。例えば、分析物は抗体、固定化された反応物は抗原、またはその逆であり得る。

曲線図の下には、フローセルのいくつかの模式的な断面図が示されており、それぞれ数字を付けられ、フローセルを通る試料の通過の異なるフェーズを表している。センサ記録(SPR角度)および反射率最小値( $R_{\min}$ )曲線上のそれぞれのフローセル部分に対応するそれぞれの点は、フローセル部分と同じ数字で示される。フローセル部分において、例えば、約 $0.7\mu\text{m}$ のエバネセント波の貫入深さに対応する監視されるセンサ表面体積(分析物含有)、すなわちセンサ体積は記号 S で示されている。センサ体積の底部分は、反応物が固定化された(図示せず)(例えば、約 $100\text{nm}$ の深さを有する)反応層、すなわちマトリクスを含んでいる。

数字 1 は、試料溶液の導入前の、溶媒のみがセルを通過しているフローセル状態に対応する 2 本の曲線のベースラインを示している。センサ体積の屈折率は、例示として例えば $1.335$ であり、溶媒および固定化された反応物の屈折率によって規定される。

2 (時間=0)においては、試料溶液(溶媒 L に溶解した試料 P を加えたもの)が、フローセルへの侵入を始めるが、屈折率の変化はまだ認められない。

3においては、試料の先頭が、フローセル部分をほぼ通過し、フローセル体積において高い試料不均一性を示す。試料分析物がフローの中心核に集中し、大幅

にはセンサ体積に拡散していないため、屈折率は、まだ主に溶媒および固定化された反応物により測定されている。この点から屈折率が上昇し始めるが、反射率最小値には顕著な影響はない。

4 ( $t = t_1$ )においては、フローセルは試料溶液に完全に満たされ(すなわち、試料溶液に対して均一性)、分析物は反応層に拡散し始め、固定化された反応物と結合する。反応動力学は質量輸送によって制限されるため、従来技術において十分に確立されているように、反射率曲線のこの部分から、センサ体積中の試料濃度を測定することができる。この時点における屈折率は、例示として例えば、約1.336である。

5においては、センサ体積の側方への広がり約半分が結合した反応物を含有し、センサ体積の最大不均一性を生じ、これにより反射率最小値のピークが生じる。この段階において、動力学は、質量輸送、および反応速度の両方に依存している。

6においては、反応物は、センサ体積の側方への広がり全体にわたって結合しており、センサ体積中の分析物濃度は均一である。反射率最小値は、ベースラインレベルにまで低下している。ここにきて、反応動力学は、完全に反応速度により制御されており、会合速度定数をセンサ記録から測定し得る。この時点における屈折率は、約1.356である。

7 ( $t = 0$ )においては、全試料プラグ(plug)が、フローセルをほぼ通過し終わり、非結合分析物に取って代わる洗浄溶液Lに置換され始める。

8においては、洗浄溶液がフローセル体積の半分より多くを占め、非結合または緩く結合した分析物が、センサ体積の約半分から取り除かれている。これにより、反射率最小値曲線において観察される速い急上昇を生じるセンサ体積中の瞬間不均一性が生じる。センサ記録曲線の対応するステップは、体積(bulk)屈折率変化により生じる。この時点における屈折率は、例えば、例示として約1.355であり得る。

9 ( $t$  = 洗浄溶液の導入から  $t_1$ ) において、センサ体積中において均一な反応物濃度が認められ、従って、反射率最小値曲線は、試料プラグ以前と実質的に同じベースラインレベルに戻る。結合分析物の動力学的に制御された解離が開始し

ており、解離速度定数を計算し得る。

10 は、センサ体積内の (持続的な) 不均一性の度合いが高い場合の、上記 9 と対応する点を示す。従って、反射率最小値曲線は、9 のように元のベースラインレベルに戻らず、上昇したベースラインレベルを示す。上記 9 と同様、解離は反応により制限されるため、解離速度定数を計算し得る。

11 において (フローセル部分は図示せず)、解離定数が高い場合には、有意な脱離 (disorption) が認められ、センサ体積内で高い試料不均一性を生じ、これにより、反射率最小値曲線がピークを生じる。この段階において、動力学は、質量輸送および反応速度の両方に依存する。ここにきて、センサ記録曲線は、例えば、約 1.350 の屈折率に対応した、低いレベルに到達する。

例えば、フローセル体積  $0.05 \mu\text{l}$  および流速  $5 \mu\text{l}/\text{分}$  の場合には、フローセル中の液体が交換されるまでの時間  $t_1$  は 0.6 秒である。

上記したように、反射率最小値 ( $R_{\min}$ ) 曲線を監視することによって、(i) いつ試料がセンサ表面に到達し、結合し始めるか、および (ii) いつ試料プラグが通過し、試料に取って代わる洗浄溶液によって置換されるかを示される。これは、キャリアー緩衝液フローへの試料の注入、および区分化された試料溶液輸送の両方に適用される。従って、センサ表面の一部にある緩衝液とセンス表面の他の部分にある試料とが同時に存在する時間を判断し、この時間を対応する SPR 角度変化に関係づけることが可能である。

これにより、会合および/または解離フェーズがそれぞれ、反応速度を制御されている時間、つまり  $R_{\min}$  が、ピークを通過し再度安定化する時間に、動力学定数の測定を連続的に同期させる事が可能になる。例えば、上記 BIAcore™ (Pharmacia Biosensor AB) の様な装置において、そのような同期を自動的に提供する (例えば、ソフトウェアベース) 手段は容易に設計し得る。

会合および解離フェーズの動力学的制御についての上記時間の決定において得

られた、向上した正確度により、以前よりも有意に高い正確度、かつより少ない労力および困難で、動力学的定数が決定されることが理解される。

また、上記において、SPR角度データの動力学と同時に、反応膜内の不均一性の度合いが、例えば、凝集体の形成または分離、結晶化、ガス形成、温度変化、

フェーズまたはドメイン形成/分解の結果として測定され得ることが実証された。

従って、反応膜の構造または状態における、例えば、均一性/不均一性変化の開始の時間、特異性または表面濃度が、好ましくは上記した様に自動的に、正確に測定され得る。SPR角度-時間曲線から、反応膜の対応する特異性または表面濃度を測定し得る。

エバネセント波により感知された体積内での、均一性/不均一性の定量的変化についての、時間、特異性、および/または表面濃度のそのような自動的な測定により、試料分子の機能特性に対するこの反応の依存性を、以前より有意に高い正確度、かつより少ない労力および困難で測定し得る。

当然、センサ膜構造内における持続的变化の存在も容易に測定し得る。

以下の限定することのない実施例において、センサチップCM5(カルボキシメチルデキストラン層を、長鎖炭化水素の単層を介して支持した金メッキされたガラススライド)BIAcore™システムで実験を行った(両方とも、Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Swedenから入手)。

#### 実施例 1

製造者の指示に従って、大豆トリプシンインヒビター(STI) (Sigma) を、センサチップ表面に固定化した。まず、表面を、1:1のN-エチル-N-(3-ジエチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で3分間活性化した。次いで、10mMクエン酸(pH4.0)中の80 $\mu$ g/mlのSTIを、7分間注入した。エタノールアミン-ヒドロクロライド(pH 8.5)で残留した活性化基の不活性化を7分間行った。表面をHClで洗浄した。固定化処理の間の体積流は5 $\mu$ l/分であった。緩衝液として、10 mM Hepes、150 mM NaCl、および0.05% BIAcore™界面活性剤P20(pH7.4)を使用した。

次いで、異なる濃度のウシ膵臓トリプシン(BTP) (Sigma) を用いた動力的解析処理を、BTPと固定化されたSTIとの相互作用の動力的定数を測定するためにを行った。体積流速は $10\mu\text{l}/\text{分}$ であった。

実験において、SPR反応、および反射率最小値 $R_{\min}$ を監視した。反射率最小値曲線から、 $R_{\min}$ の最大値に対応した時間点 $t$  ( $R_m$ ) を抽出した。サンプリング時

間は0.2秒であった。HClを用いてセンサ表面の再生を行った。

図2 aは、25nMトリプシン、および413 RU(共鳴単位(Resonance Units)-1000 RUは、SPR角度を $0.1^\circ$  シフトしたもの、または0.001の屈折率変化に対応する)に対応するSTIの表面濃度について得た関連する $R_{\min}$ 曲線を有する典型的なセンサ記録部分を示す。図2 aに示すように、 $R_{\min}$ 曲線の最大値は、関連部分(図示されたセンサ記録部分)において生じた。 $R_{\min}$ 変化が約0.06%であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約60%である。 $R_{\min}$ は、その後、およそ試料非含有溶液のレベルにまで戻る。

上記のケースは、類似した屈折率/反射率曲線を有する2つのフェーズの状態の代表例である。被覆率0.4のフェーズ1 ( $n=1.335$ )、および被覆率0.6のフェーズ2 ( $n=1.3353$ ) を介する遷移を有した2フェーズ膜モデルの $R_{\min}$ の計算から、図2 bに示す結果を得た。 $R_{\min}$ ピーク値が約0.02%であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は、フェーズ2の被覆率1.0に対応する約58%であった。

解析データから、質量輸送/動力的に制御された限界点(break point)の発生が、 $R_{\min}$ が最大値を通過し、安定したレベルに戻るまでの時間事象と関連したと確定し得る。従って、センサ記録と共に $R_{\min}$ 値を観察することにより、質量輸送制御と、動力的制御との間のより広い相互作用に対応した時間値が測定され得る。つまり、この時間値を、評価スキームにフィードすることにより、会合および解離速度定数の計算を容易かつ向上する可能性を有している。

## 実施例 2

実施例1 および2に類似した手法により、流速 $5\mu\text{l}/\text{分}$ において、センサ表面上でのウサギ抗マウスIgG (RAMFc) の吸着による固定化を調べた。得られたセンサ記録、および反射率最小値( $R_{\min}$ ) 曲線を、図3 aに示す。図面から明らかな様

に、 $R_{\min}$ 値のピークが約26%(15611/60000)であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約70%である。ピーク後、 $R_{\min}$ は、試料非含有溶液の値程度まで戻る。

上記ケースは、高い試料濃度、かつ十分に分離した屈折率/反射率曲線を有する2つのフェーズの状態の代表例である。被覆率0.57のフェーズ1 ( $n=1.3339$ )、および被覆率0.43のフェーズ2 ( $n=1.3498$ )を介する遷移を有した2フェーズ膜モ

デルの $R_{\min}$ の計算から、図3 bに示す結果を得た。 $R_{\min}$ ピーク値が約20%であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約57%であった。

### 実施例 3

実施例1に類似した手法により、センサ表面を他のバッチのウサギ抗マウスIgG(RAMFc)で固定化し、流速 $5\mu\text{l}/\text{分}$ にて、表面との相互作用を調べた。得られたセンサ記録および反射率最大値( $R_{\min}$ )曲線を図4 aに示す。図面から明らかのように、 $R_{\min}$ 値のピークが約28%(16900/60000)であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約74%である。ピーク後、 $R_{\min}$ は、試料非含有溶液の値には戻らないが、より高いレベルにおいて安定化し、感知された表面層体積中での持続的な不均一性を示す。試料溶液中における粒子の沈殿(RAMFcの凝集体形成)も、別の独立した方法により検出した。

上記ケースは、十分に分離した屈折率/反射率曲線、および粒子表面膜構造を有する2つのフェーズの高い試料濃度および粒子堆積の状態の代表例である。被覆率0.6のフェーズ1 ( $n=1.3425$ )、および被覆率0.4のフェーズ2 ( $n=1.3512$ )を介する遷移を有する2フェーズ膜モデルの対応する $R_{\min}$ の計算から、図4 bに示す結果を得た。フェーズ2の被覆率が1において、 $R_{\min}$ ピーク値が約23%であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約79%であった。

被覆率0.33のフェーズ1 ( $n=1.3339$ )、被覆率0.33のフェーズ2 ( $n=1.3425$ )、および被覆率0.33のフェーズ3 ( $n=1.3512$ )を介する遷移を有する3フェーズ膜の $R_{\min}$ についての対応した計算から、図4 cに示す結果を得た。 $R_{\min}$ ピーク値が約35%であると同時に、 $R_{\min}$ 角度の最大変化は約82%であった。

上記2つの計算モデルはいずれも、実験データに対応する結果をもたらさなかったが、実験結果をシミュレートするのに、それぞれの屈折率および表面被覆率

の分布を有するフェーズをより多く適合させることが可能であることを実証する  
のに十分な程度に一致した。

【図 1】

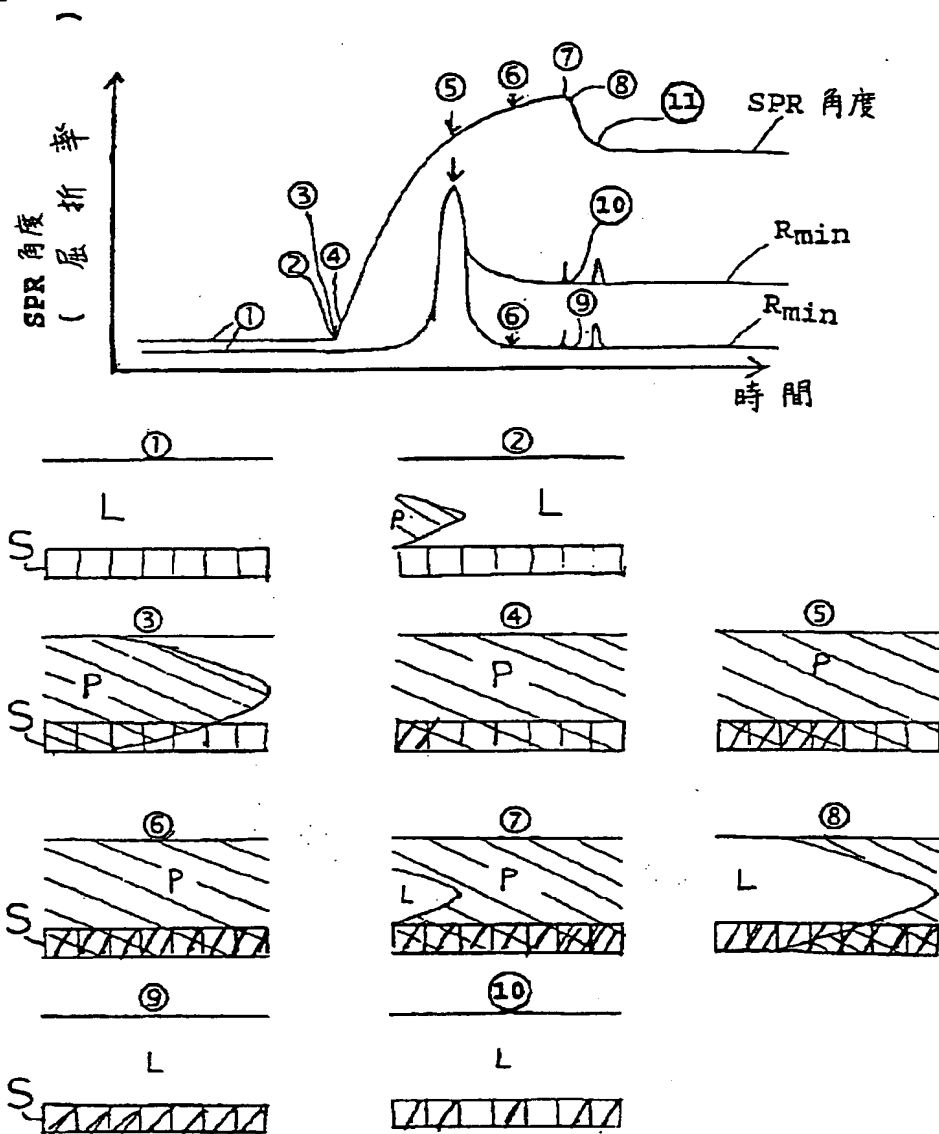


FIG. 1

【図 2】

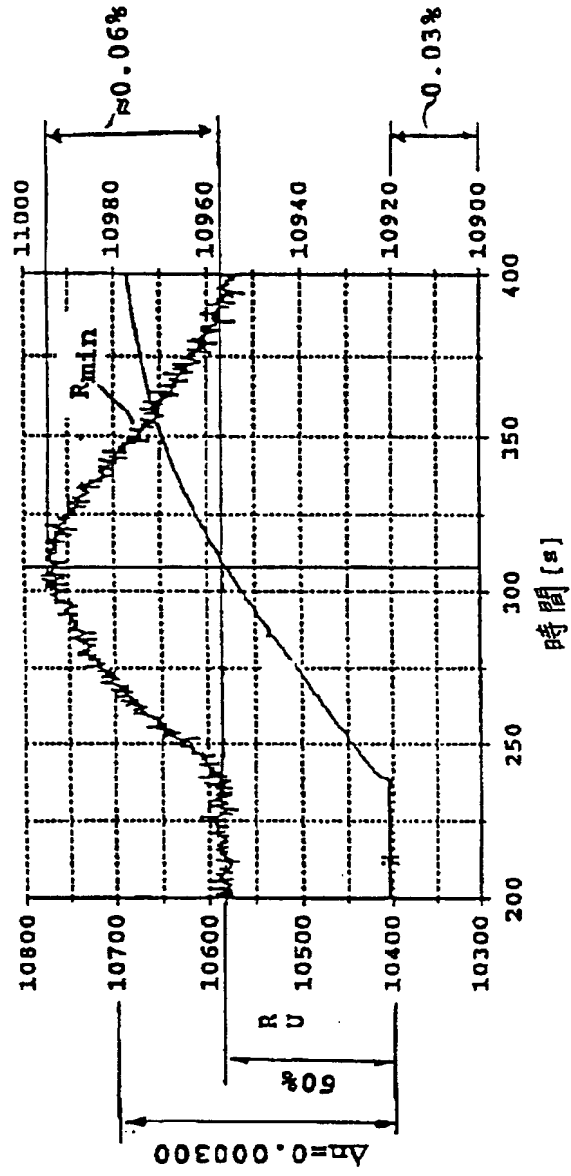


FIG. 2a

【图 2】

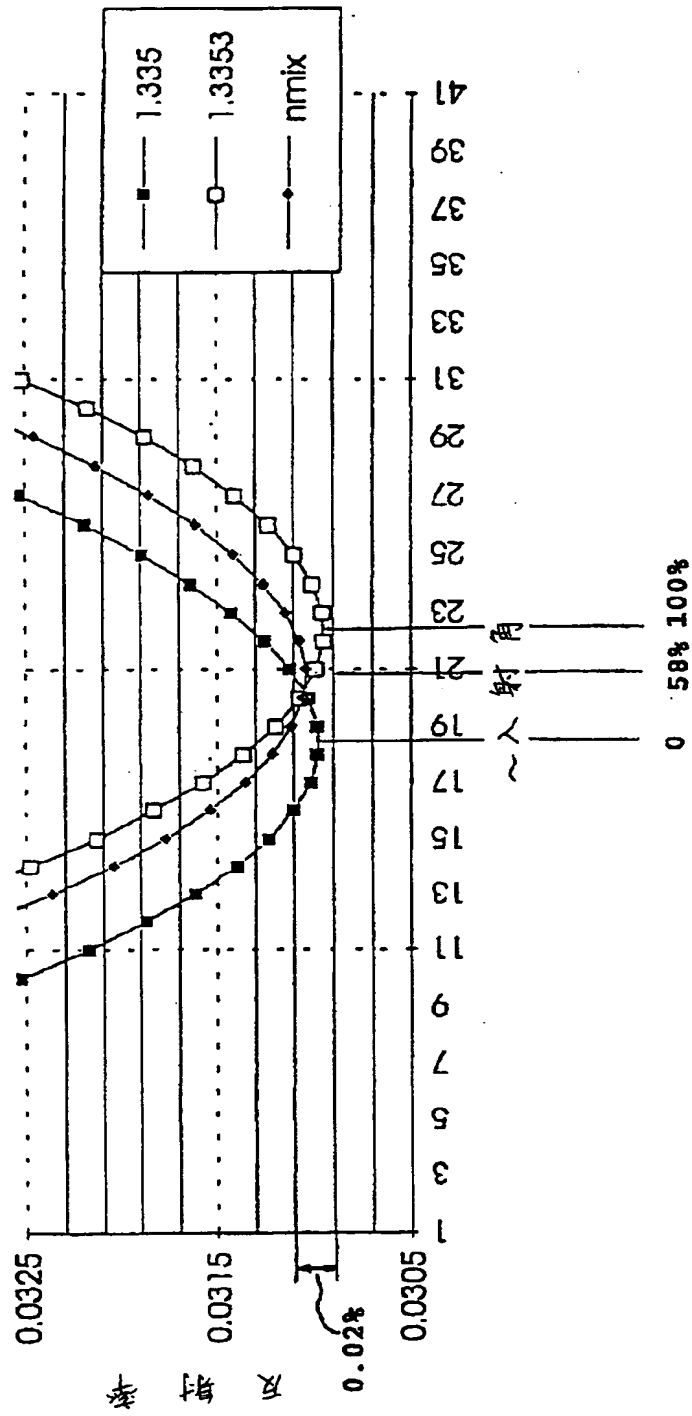


FIG. 2b

【図 3】

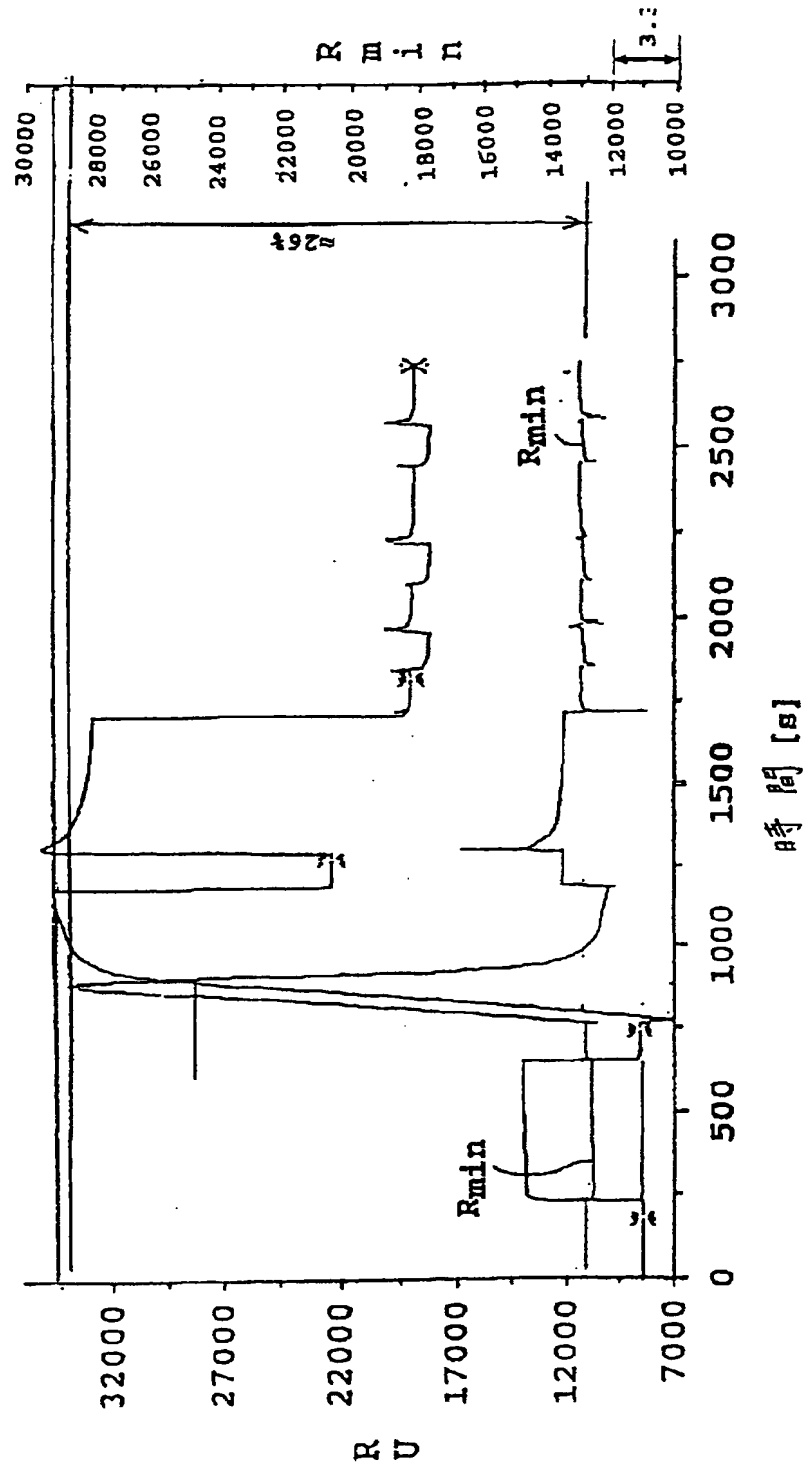


FIG. 3a

【图 3】

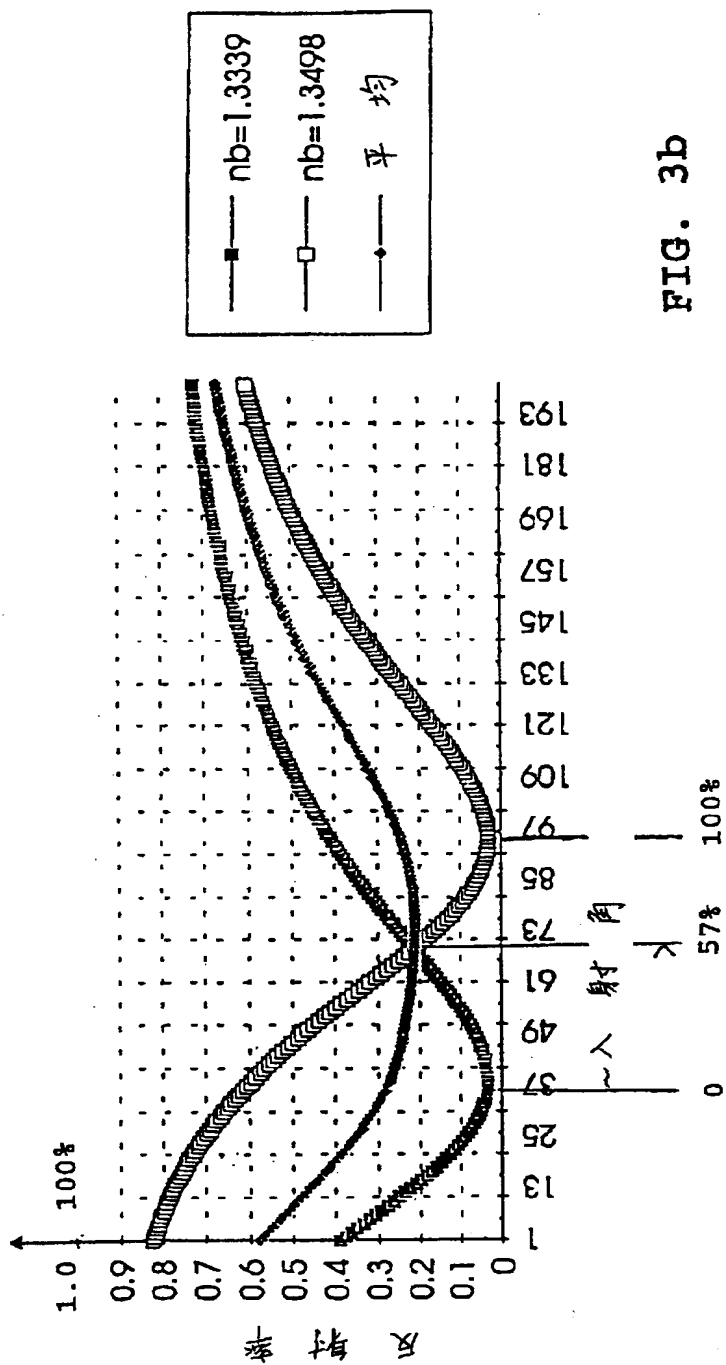


FIG. 3b



【图 4】

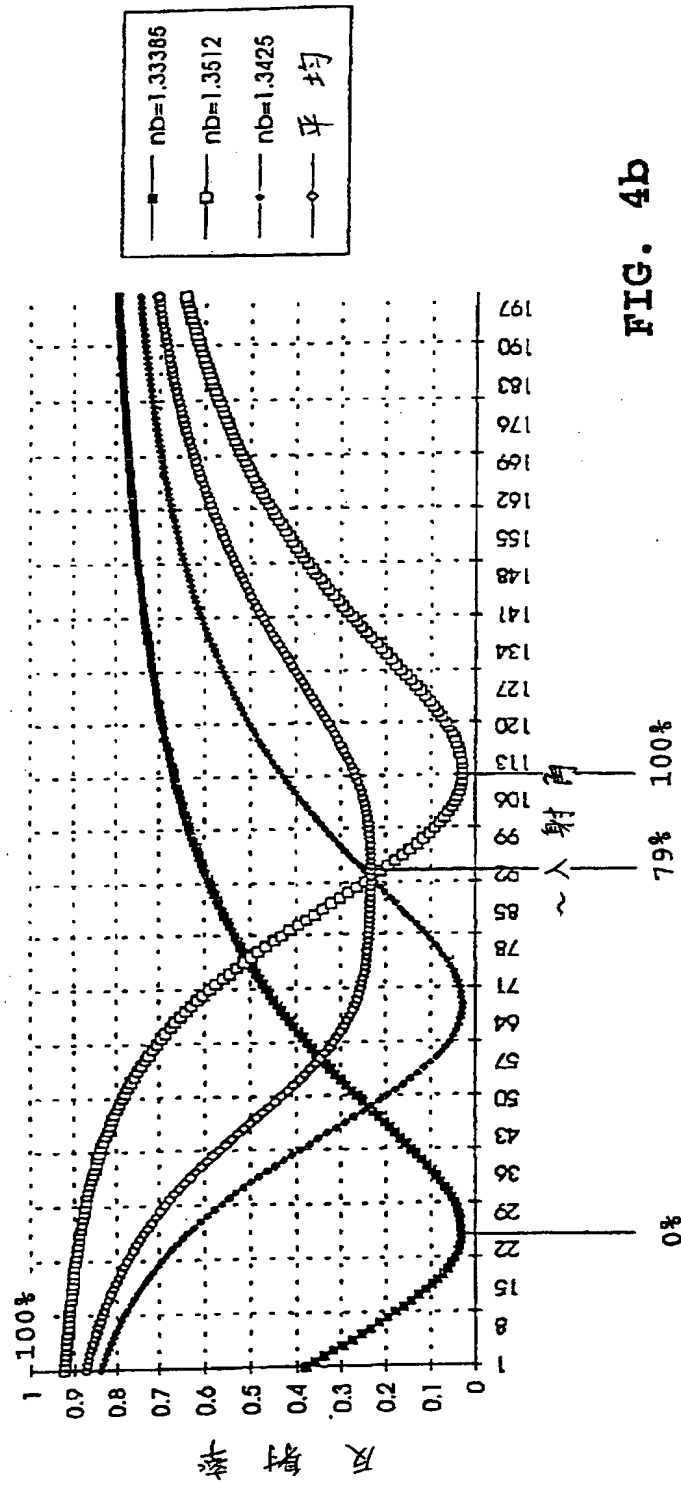


FIG. 4b

【图 4】

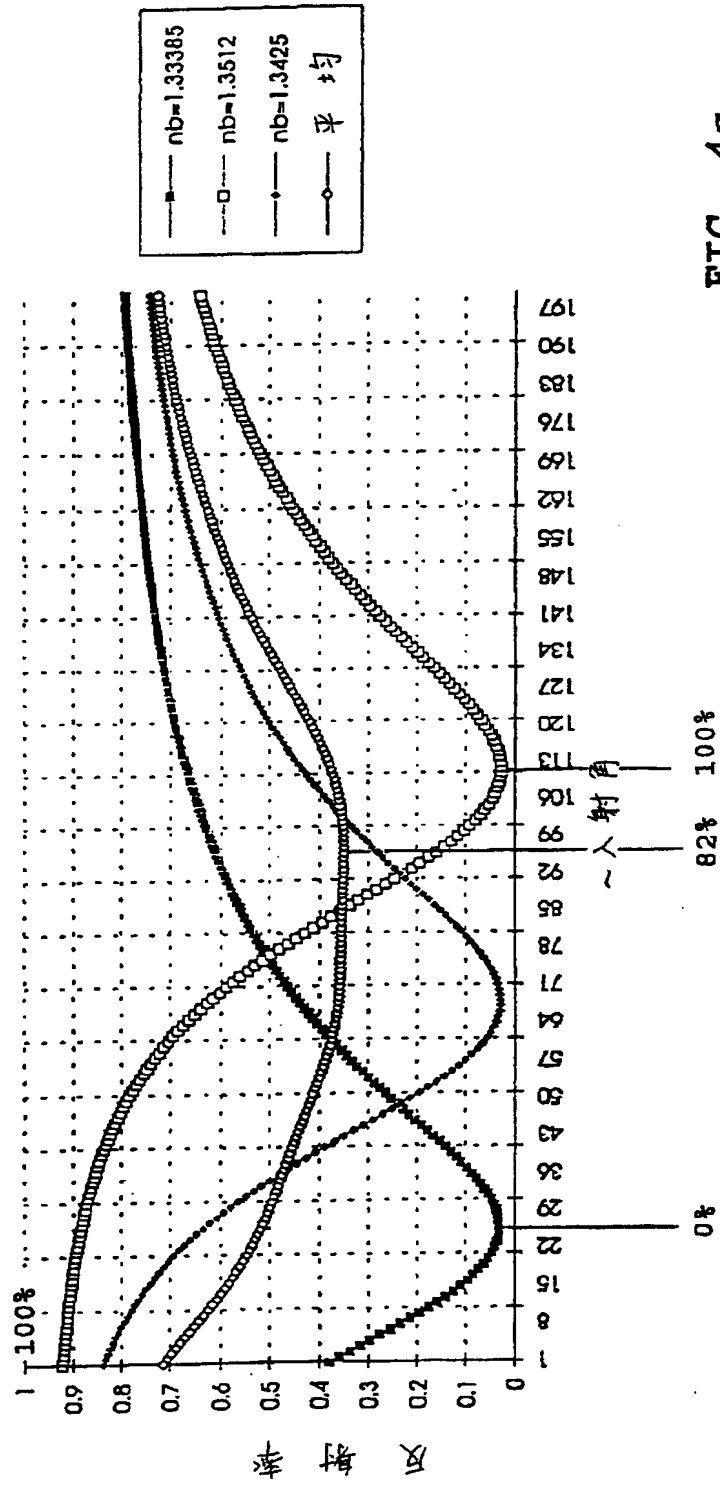


FIG. 4c

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 96/01074

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC6: G01N 33/543, G01N 21/55 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Chromatography, Volume 597, 1992, Lars G. Fägerstam et al, "Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis", page 397 - page 410, see pages 401, 404-406, figures 12,13 and 20 --	1-3,5-10, 12-22
X	Analytical Biochemistry, Volume 213, 1993, Ralf W. Glaser, "Antigen-Antibody Binding and Mass Transport by Convection and Diffusion to a Surface: A Two-Dimensional Computer Model of Binding and Dissociation Kinetics", page 152 - page 161, see pages 152-3 and 160 --	1-3,5-10, 12-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 December 1996		12 -12- 1996
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Carl-Olof Gustafsson Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 96/01074

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Analytical Biochemistry, Volume 227, 1995, Thomas A. Morton et al, "Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation, and Numerical Integration", page 176 - page 185, see page, the whole document eg. page 183, right column second paragraph --	1-22
A	Eur.J. Biochem., Volume 217, 1993, L. Clem Gruen et al, "Determination of relative binding affinity of influenza virus N9 sialidases with the Fab fragment of monoclonal antibody NC41 using biosensor technology", page 319 - page 325, see figures 1-3 --	1-22
A	Biochimica et Biophysica Acta, Volume 1195, 1994, Zdzislaw Salamon et al, "Assembly and molecular organization of self-assembled lipid bilayers on solid substrates monitored by surface plasmon resonance spectroscopy" page 267 - page 275 --	1-22
A	Optics Communications, Volume 64, No 6, December 1987, J.D. Pollard et al, "The Time-Dependence of the Growth of Thin Organic Liquid Layers on a Gold Surface, Studied by Surface-Plasmon Polariton Techniques" page 529-33 -- -----	1-22

---

**【要約の続き】**

の程度のうちの少なくとも一方を決定することを特徴とする。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**